

**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> :</b> <b>C07H 1/08, C12N 15/10, C12P 19/34</b>		<b>A1</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 95/21179</b>
			<b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 10. August 1995 (10.08.95)
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP95/00391		<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AU, CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
<b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 3. Februar 1995 (03.02.95)			
<b>(30) Prioritätsdaten:</b> P 44 03 692.2 7. Februar 1994 (07.02.94) DE P 44 22 291.2 25. Juni 1994 (25.06.94) DE P 44 31 125.7 1. September 1994 (01.09.94) DE P 44 32 654.8 14. September 1994 (14.09.94) DE		<b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
<b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> QIAGEN GMBH [DE/DE]; Max-Volmer-Strasse 4, D-40724 Hilden (DE).			
<b>(72) Erfinder; und</b>			
<b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> COLPAN, Metin [TR/DE]; Uhlandstrasse 5, D-45219 Essen (DE). MORITZ, Peter [DE/DE]; Platanenallee 7, D-50169 Kerpen (DE). SCHORR, Joachim [DE/DE]; An der Schützenwiese 43, D-40231 Düsseldorf (DE).			
<b>(74) Anwälte:</b> MEYERS, Hans-Wilhelm usw.; Postfach 10 22 41, D-50462 Köln (DE).			
<b>(54) Title:</b> ENDOTOXIN REDUCTION OR REMOVAL PROCESS			
<b>(54) Bezeichnung:</b> VERFAHREN ZUR ABREICHERUNG ODER ENTFERNUNG VON ENDOTOXINEN			
<b>(57) Abstract</b> <p>A process is disclosed for reducing or removing endotoxins from compositions containing therapeutic active substances extracted from natural sources by genetic engineering and/or biotechnology. For that purpose, the compositions are treated with chromatographic materials. The natural sources are disintegrated, the thus obtained fractions are, if required, centrifuged, filtered or treated using affinity chromatography methods, the fractions are pre-incubated in an aqueous salt solution and detergents, are treated with anion exchange materials, then washed with another salt solution. The active substances are eluted from the anion exchanger then further purified in a manner known per se.</p>			
<b>(57) Zusammenfassung</b> <p>Verfahren zur Abreicherung oder Entfernung von Endotoxinen aus für den therapeutischen Einsatz vorgesehenen Wirkstoffe enthaltenden Präparaten, die gen- und/oder biotechnologisch aus natürlichen Quellen gewonnen werden, durch Behandlung mit chromatographischem Material, wobei die natürlichen Quellen aufgeschlossen werden, die erhaltenen Fraktionen gegebenenfalls zentrifugiert, filtriert oder mit Affinitätschromatographischen Methoden behandelt werden, die Fraktionen mit einer wässrigen Salzlösung und Detergenzien vorinkubiert werden, mit Anionenaustauscher Material behandelt werden und danach mit einer weiteren Salzlösung gewaschen werden und die Wirkstoffe von dem Anionenaustauscher eluiert werden, um dann in an sich bekannter Weise weiter aufgereinigt zu werden.</p>			

# **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

- 1 -

Verfahren zur Abreicherung oder Entfernung von Endotoxinen

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Abreicherung oder Entfernung von Endotoxinen aus für den therapeutischen Einsatz vorgesehenen Wirkstoffe enthaltenden Präparaten, die gen- und/oder biotechnologisch aus natürlichen Quellen gewonnen werden, durch Behandlung mit chromatographischem Material, sowie eine entsprechende Verwendung, eine wäßrige Lösung zur Rückführung des Verfahrens und eine Zusammenstellung enthaltend Elemente zur Durchführung des Verfahrens.

Molekularbiologische Verfahren gewinnen zunehmend Bedeutung bei der Herstellung von Arzneimitteln. Dazu gehören zum einen die klassischen gentechnologischen Verfahren zur Herstellung von Arzneimitteln und in zunehmenden Maße auch die sogenannte Gentherapie, bei der Nucleinsäuren in das Genom zu behandelnder Spezies eingeschleust werden. Dabei bekommt die Entfernung von Endotoxinen entscheidende Bedeutung.

Um beispielsweise Plasmid DNA im präparativen Maßstab herzustellen, ist es notwendig die Plasmide mit Hilfe sogenannter Wirtszellen zu vermehren. Hierbei handelt es sich im allgemeinen um gram-negative Enterobakterien, wie beispielsweise Mutanten von E.coli K-12. Gram-negative Bakterien weisen eine

Zellwand auf, die von einer äußeren Membran umgeben ist. Auf dieser Membran befinden sich sogenannte Lipopolysaccharide (LPS), die auch unter dem Begriff Endotoxine bekannt sind. Die Endotoxine sind beispielsweise verantwortlich für die typischen Erscheinungen, die mit einer bakteriellen Intoxikation verbunden sind, wie entzündlichen Reaktionen und Fieber sowie endotoxischem Schock.

Wie in der P 44 03 692 und P 44 22 291 erwähnt ist, wird innerhalb der in vivo und ex vivo Gentherapie Plasmid DNA zur Behandlung von genetisch bedingten Erkrankungen wie beispielsweise der cystischen Fibrose, aber auch zur Behandlung von Krebs oder Hämophilie bzw. zur Immunisierung gegen Infektionskrankheiten verwendet (TIBTECH, Special Issue: Gene Therapy Therapeutic Strategy and Commercial Prospects, Mai 1993, Vol. 11, Nr. 5 (112)). Dabei ist es von entscheidender Bedeutung, daß die verabreichte DNA keine Nebenreaktionen wie beispielsweise inflammatorische oder nekrotische Reaktionen hervorruft. Es muß also sichergestellt sein, daß die für diese Art der Behandlung verwendete DNA nicht mit Endotoxinen kontaminiert ist.

Auch gentechnologisch oder biotechnologisch hergestellte Präparate können Endotoxine enthalten. Wichtig ist daher die Entfernung oder Abreicherung der Endotoxine unter physiologisch unbedenkliche Mengen.

Die zur Zeit bekannten Reinigungsverfahren, beispielsweise für Plasmid DNA aus gram-negativen Bakterien, können die Endotoxine nicht vollständig aus der Plasmid DNA entfernen. Zu diesen Methoden gehören zum Beispiel Cäsiumchlorid Gradienten Zentrifugation oder Anionenaustauscher-Chromatographie.

Die Cäsiumchlorid-Gradientenzentrifugation beruht darauf, daß verschieden große DNA-Moleküle eine unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit in einem Salzgradienten aufweisen.

- 3 -

Lipopolysaccharide zeigen jedoch das gleich Migrationsverhalten im Dichtegradienten wie die DNA und sind somit nicht effektiv von der DNA zu trennen.

Verglichen mit der Anionenaustauscher-Chromatographie ist die Cäsiumchlorid-Gradientenzentrifugation sehr zeitaufwendig und verwendet eine Reihe von toxischen Substanzen, wie beispielsweise Ethidiumbromid. Weiterhin muß durch eine zusätzliche Dialyse Cäsiumchlorid entfernt werden.

Aida und Pabst in "Removal of endotoxin from protein solutions by phase separation using Triton X 114", J. Immunol. Methods 132, 191 - 195 (1990) schlagen eine Methode vor, um Endotoxine mittels Triton-X114 Extraktion aus Protein Lösungen zu entfernen. Hierbei wird die zu behandelnde Lösung mit dem Detergenz Triton X 114 versetzt. Die proteinhaltige, wäßrige Phase wird nach Inkubation und Zentrifugation abgenommen und das Endotoxin befreite oder an Endotoxin abgereicherte Protein präzipitiert. Wie in der P 44 03 692 bereits vorgeschlagen wird, kann dieses Verfahren auch zur Extraktion von Endotoxinen aus DNA-Lösungen angewandt werden. Diese Methode ist jedoch durch einen recht hohen Arbeitsaufwand gekennzeichnet und wird erst nach der Isolierung der DNA eingesetzt. Für die Reinigung von DNA-Mengen im präparativen, insbesondere im industriellen Maßstab, ist dieses Verfahren weniger geeignet.

Das der Erfindung zugrundeliegende technische Problem besteht nunmehr darin ein Verfahren anzugeben, mit dem es gelingt endotoxinfreie oder an Endotoxinen abgereicherte Präparate herzustellen, die für den therapeutischen Einsatz vorgesehene Wirkstoffe enthalten und aus gen- und/oder biotechnologischen Quellen stammen. Die oben beschriebenen Nachteile soll das erfindungsgemäße Verfahren vermeiden. Dabei soll die Aufreinigung der DNA und die Abtrennung oder Abreicherung der Endotoxine im selben Verfahren oder Verfahrensschritt erfolgen.

Das technische Problem wird gelöst durch ein Verfahren mit den Merkmalen des Anspruchs 1. Die Unteransprüche 2 bis 7 betreffen bevorzugte Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens. Anspruch 8 betrifft die Verwendung eines Anionenaustauschers zur Abreicherung oder Entfernung von Endotoxinen aus nucleinsäurehaltigen Präparaten.

Beim erfindungsgemäßen Verfahren werden zunächst die natürlichen Quellen, aus denen die für den therapeutischen Einsatz vorgesehenen Wirkstoffe enthaltenden Präparaten gen- oder biotechnologisch gewonnen werden, aufgeschlossen. Der Aufschluß erfolgt dabei vorzugsweise nach an sich bekannten Verfahren wie beispielsweise der alkalischen Lyse, aber auch bei anderen Lyseverfahren, wie beispielsweise der Anwendung von hohem Druck (French Press), der Boiling Lyse oder der Verwendung von Detergenzien oder Lysozym. Gegebenenfalls wird das mit der alkalischen Lyse gewonnene Material durch Zentrifugations- oder Filtrationsschritte von groben Zellbruchstücken befreit.

Vor der eigentlichen Reinigungsprozedur, beispielsweise mittels üblicher Anionenaustauscher-Chromatographie, wird erfindungsgemäß das "cleared lysate" (cL), das zum Beispiel durch die alkalische Lyse erhalten wurde, anschließend gemäß der in der P 44 32 654 vorgeschlagenen Verfahrensweise filtriert wird und dann mit bestimmten Salz/Detergenzien-Kombinationen vorinkubiert.

Die deutsche Patentanmeldung P 44 32 654.8 schlägt ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Isolierung von Zellinhaltsstoffen, wie Nucleinsäuren, aus natürlichen Quellen vor. Das dort beschriebene Filtrationsverfahren zur Präparation von Nucleinsäuren geht davon aus, daß die nucleinsäurehaltigen Quellen aufgeschlossen werden, der Aufschluß für einen Zeitraum ruht, der resultierende Aufschluß eine Filterschicht aus Glas, Silicagel, Aluminiumoxid oder geschütteter

- 5 -

Diatomeenerde oder verwebter oder verklebter Vliese aus Glasfaser und Silicagel sowie Cellulose, Papier, gepreßtem Papier, Vliesen aus Papier sowie Partikel oder Schichten, Membranen oder Kunststoffe, wie beispielsweise non woven fabrics, basierend auf Polypropylen, passiert, danach die aus der Filterschicht austretende Fraktion aufgefangen wird und anschließend die Nucleinsäure aus der aufgefangenen Fraktion weiter aufgearbeitet wird. Dabei können die Filterschichten so modifiziert sein, daß keine Affinität zur Nucleinsäure besteht, insbesondere durch Hydroxylgruppen tragende Mineralien oder beschichtete Mineralien, insbesondere Diol-Silicagel, Diol-Diatomeenerde und/oder Diol-Perlite. Dies kann unter Bedingungen erfolgen, bei denen Silicagel keine Affinität zu Nucleinsäuren besitzt. Eine bevorzugte Vorrichtung zur Durchführung des in P 44 32 654.8 vorgeschlagenen Verfahrens weist vorzugsweise einen zylindrischen Hohlkörper auf, in dem eine Filtrationseinrichtung angeordnet ist. Die Filterschicht besteht insbesondere aus einer geschütteten Lage Diatomeenerde, deren Partikelgröße im Bereich von 5  $\mu\text{m}$  bis 500  $\mu\text{m}$  bei einer gesamten Filterschichtdicke von 0,1 bis 200 mm beträgt. Es kann dann vorteilhaft sein, eine zusätzliche Schicht in dem Hohlkörper anzuordnen und zwar oberhalb und/oder unterhalb der Diatomeenerdeschicht, welche ein vorzeitiges Einbringen der zu filtrierenden Lösung in den Filter oder das Austreten der Lösung aus der vorgeschlagenen Vorrichtung verhindert.

Die in der P 44 32 654 vorgeschlagene Vorrichtung ist vorteilhafterweise mit weiteren zur Nucleinsäurepräparation brauchbaren Instrumenten kombinierbar, wie sie beispielsweise in der P 31 39 664 offenbart sind.

Die P 41 27 276 offenbart Anionenaustauscher, die in eine Membran eingebettet sind (3M Empore-Membran). Diese Systeme sind unter der Bezeichnung QIAWELL erhältlich.

Als Inkubationslösungen kommen beispielsweise Salzlösungen von Natriumchlorid, Kaliumchlorid, Guanidiniumhydrochlorid, Natriumperchlorat und anderen chaotropen Salzen in Frage.

Als Detergenzien können insbesondere solche wie NP40, Tween 80, Tween 20, Triton X 100, Triton X 114, Syperonic F-68 oder andere nicht ionische Detergenzien verwendet werden. Die Detergenzien liegen vorzugsweise in Konzentrationen von 0,1 % bis 30 % vor. Die Salzlösungen weisen üblicherweise Ionenstärken auf, die einer Ionenstärke einer 0,1 - 2,0 M NaCl-Lösung entsprechen.

Weiterhin kann das filtrierte Lysat auch mit einem Affinitäts-chromatographischen Material inkubiert werden. Hierbei kommt insbesondere ein an Silicagel gebundener Celatbildner in Betracht. Bewährt haben sich Affinitätsmaterialien, wie mit NTA (Nitrilotetraacetat) oder IDA (Iminodiacetat) modifizierte Silicaoberflächen. Auf diesem Affinitätsträger sind beispielsweise Nickelionen komplex gebunden, welche über weitere Koordinationsstellen mit in der Seitenkette stickstoffhaltigen Aminosäureresten in Proteinen in Wechselwirkung treten können. Das filtrierte Lysat kann insbesondere mit Ni-NTA-Chromatographiematerial auf Kieselgelbasis inkubiert werden. Das Chromatographiematerial kann beispielsweise nach der erfolgten Inkubation abzentrifugiert werden, sofern im Batch-Verfahren gearbeitet wurde, und der Überstand kann über Anionenaustauscher oder andere Materialien weiter gereinigt werden. Neben dem Batch-Verfahren kann aber auch in Säulen gearbeitet werden, sofern die Beschaffenheit der Probe dies ermöglicht.

Der Anionenaustauscher ist vorzugsweise ein Material auf Basis von polymerem anorganischem Trägermaterial, wie Acryl, Dextran, Agarose oder Kombinationen davon, wobei die hier an den Anionenaustauscher gebundenen Gruppen eine Oberflächenladung von 1 bis 4  $\mu\text{M}/\text{m}^2$  Trägeroberfläche entsprechend 0,5 bis 500  $\mu\text{M}/\text{ml}$  aufweisen. Vorzugsweise kann das in der



- 7 -

P 44 03 692 vorgeschlagene chromatographische Trägermaterial als modifiziertes poröses oder nicht poröses anorganisches und/oder organisches Material verwendet werden. Weiterhin können Anionenaustauschermaterialien, wie zum Beispiel QIAGEN®, DEAE-Sephrose®, Q-Sephrose®, DEAE-Sephadex®, Poros 20 M/P und/oder Poros 50 M/P nach der von Endotoxin befreienden Behandlung verwendet werden.

Im Anschluß an die erfindungsgemäße Verfahrensweise zur Entfernung oder Abreicherung von Endotoxinen kann die DNA auch über anorganische Materialien, wie Silicagel, Diatomeenerde, Glas, Aluminiumoxid, Titanoxid, Hydroxylapatit oder über anorganische Materialien, wie Agarose, Dextran, Acrylamid, Polystyrolharze sowie Copolymere aus den monomeren Bausteinen der genannten Monomere, aufgereinigt werden.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren lassen sich insbesondere Wirkstoffe wie Nucleinsäure zum Beispiel Plasmid-DNA endotoxinfrei erhalten. Desweiteren können Nucleinsäuren wie RNA, YACs oder genomische DNA der Größen von 6 bp bis 1.000 kbp endotoxinfrei erhalten werden. Als natürliche Quellen, aus denen beispielsweise die Nucleinsäuren oder die Wirkstoffe für den therapeutischen Einsatz gewonnen werden, sind beispielsweise Zellen, Zellorganellen, Gewebe oder Mikroorganismen zu nennen.

Desweiteren können Proteinlösungen oder Viruspartikel, wie beispielsweise Adenoviren, AAV oder Retroviren, durch die erfindungsgemäße Verfahrensweise von Endotoxinen befreit oder im Endotoxingehalt abgereichert werden.

Die Vorinkubation des "cleared Lysate" erfolgt vorzugsweise mit Salzlösungen, die Alkalihalogenidsalze, nichtionische Tenside und Puffersubstanzen enthalten. Die Alkalihalogenidkonzentration entspricht hierbei einer Ionenstärke wie einer Konzentration, die 0,1 bis 2,0 M NaCl besitzt.

Die so behandelten Fraktionen werden mit dem Chromatographie-Material in Kontakt gebracht, so daß die Wirkstoffe an der Trägeroberfläche absorbiert werden. Vorzugsweise werden Salzlösungen enthaltend Alkalihalogenid, wie Natriumchlorid, Kaliumchlorid, Lithiumchlorid, etc. verwendet. Die Ionenstärke der Waschlösung entspricht in etwa einer Ionenstärke, wie sie eine 0,5 bis 2,0 M NaCl besitzt.

Das erfindungsgemäße Verfahren gewährleistet in überraschend einfacher Weise die Abreicherung oder Entfernung von Endotoxinen aus für den therapeutischen Einsatz vorgesehenen Wirkstoffe enthaltenden Präparaten, die gen- und/oder biotechnologisch aus natürlichen Quellen gewonnen werden. Überraschenderweise führt die Vorinkubation mit Salz/Detergenzien zur Abtrennung der Endotoxine ohne das Ausbeute und Reinheit der Plasmid DNA bei der sich anschließenden chromatographischen Reinigung negativ beeinflußt wird.

Die Erfindung wird anhand der folgenden Beispiele näher erläutert.

Die nachstehend abgekürzten Puffer P1, P2, P3, QBT, QC und QN besitzen die folgende Zusammensetzung:

P1	10 µg/ml RNaseA, 50 mM TrisHCl, 100 mM EDTA
P2	200 mM NaOH, 1 % SDS
P3	3 M KAc, pH 5,5
QBT	750 mM NaCl, 50 mM MOPS, 15 % Alkohol, pH 7,0, 0,15 % Triton X 100
QC	1,0 M NaCl, 50 mM MOPS, 15 % Alkohol, pH 7,0
QN	1,6 M NaCl, 50 mM MOPS, 15 % Alkohol, pH 7,0

Als Alkohole werden vorzugsweise Isopropanol oder Ethanol eingesetzt.

Beispiel 1

Reinigung von 100 mg endotoxinfreier pUC18 DNA mit Hilfe der Anionenaustauscher-Chromatographie.

Eine 10 l Fermenter-Kultur des Plasmids pUC18 wird zentrifugiert und das daraus resultierende Bakterien-Pellet mit 500 ml Puffer P1 resuspendiert und die alkalische Lyse durch die Zugabe von jeweils 500 ml Puffer P2 und P3 durchgeführt. Zelltrümmer, genomische DNA und SDS Präzipitate (SDS = Natriumdodecylsulfat) werden unter Verwendung einer Filtrationseinheit, wie sie beispielsweise in der P 44 03 692 vorgeschlagen werden, abgetrennt.

Dem "cleared Lysate (cL)" wird nun 1/10 Volumen (150 ml) eines Endotoxin Removal Buffers (750 mM NaCl/ 10 % Triton X 100/ 50 mM MOPS pH 7,0) zugegeben und mit dem cL gemischt. Das Gemisch wird für eine Stunde bei 4°C inkubiert und anschließend mittels einer Schlauchpumpe auf eine Anionenaustauschersäule von 4,4 cm Durchmesser und 50 cm Länge mit einer Flußrate von 4 ml/min gepumpt. Die Säule wurde zuvor mit 350 ml QBT Puffer (10 ml/min) äquilibriert. Die Säule wird mit 2,5 l QC (15 ml/min) gewaschen. Die Plasmid DNA wird mit 400 ml QN Puffer (3 ml/min) eluiert und anschließend mit 0,7 vol. Isopropanol präzipitiert und anschließend mit 70 %igem Ethanol gewaschen.

Die Bestimmung des Endotoxin Gehaltes erfolgt mit Hilfe des BioWhittaker LAL Tests. Die gereinigte DNA kann direkt als genetische Vakzine in Muskel oder andere Gewebe injiziert werden.

Nach der Endotoxinabreicherung weist die DNA nur noch Endotoxinkontaminationen von < 50 E.U./mg DNA auf.

Tabelle: Endotoxingehalt in DNA-Präparationen vor und nach der Anwendung des erfindungsgemäß Verfahrens.

DNA Prep.	Endotoxingehalt in E.U./mg DNA	
	<u>Vorher</u>	<u>Nachher</u>
1	2500	10
2	4200	17
3	3300	15
4	2900	15
5	3900	12

### Beispiel 2

Reinigung von 10 mg endotoxinfreier pBR322 DNA mit Hilfe der Anionenaustauscher-Chromatographie.

Eine 5 l Schüttelkultur des Plasmids pBR322 wird zentrifugiert und das hieraus resultierende Bakterien Pellet mit 125 ml Puffer P1 resuspendiert und die alkalische Lyse durch Zugabe von jeweils 125 ml Puffer P2 und P 3 durchgeführt. Zelltrümmer, genomische DNA und SDS Präzipitate werden durch Zentrifugation abgetrennt. Das Lysat wird anschließend über einen Faltenfilter geklärt.

Dem cL wird 1/10 Volumen (35 ml) eines Puffers bestehend aus 20 % NP40, 750 mM NaCl, 50 mM MOPS pH 7,0 zugegeben mit dem cL-Gemisch und für eine Stunde bei 4°C inkubiert. Die DNA wird dann wie folgt isoliert: Das vorbehandelte cL wird auf eine QIAGEN tip 10.000 Anionenaustauscher-Säule gegeben. Nach dem Durchfluß des cL wird die Säule mit dem Puffer QC gewaschen und die DNA anschließend mit Hilfe von Puffer QF (1,25 M NaCl, 50 mM Tris/HCl, 15 % Ethanol, pH 8,5) eluiert.

- 11 -

Die so hergestellte DNA kann an rekombinante Adenoviruspartikel angekoppelt werden. Der erhaltliche Adenovirus/DNA Komplex kann für in vivo bzw. ex-vivo Gentherapie verwendet werden.

Die Biomasse einer 20 l Fermenterkultur des Plasmids pUC19 wird unter Zugabe von jeweils 1 l der Puffer P1, P2, P3 lysiert und anschließend über eine in einer Säule angeordneten Diatomeenerdeschüttung filtriert. Dem filtrierten Lysat wird 20 g Ni-NTA modifiziertes Silicagel zugegeben und für 30 min. bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wird das Ni-NTA modifizierte Silicagel durch Zentrifugation abgetrennt und der Überstand über eine Anionenaustauscher-Chromatographiesäule aufgereinigt.

A n s p r ü c h e

1. Verfahren zur Abreicherung oder Entfernung von Endotoxinen aus für den therapeutischen Einsatz vorgesehenen Wirkstoffe enthaltenden Präparaten, die gen- und/oder biotechnologisch aus natürlichen Quellen gewonnen werden, durch Behandlung mit chromatographischem Material, wobei
  - die natürlichen Quellen aufgeschlossen werden, die erhaltenen Fraktionen gegebenenfalls zentrifugiert, filtriert oder mit affinitätschromatographischen Methoden behandelt werden,
  - die Fraktionen mit einer wäßrigen Salzlösung und Detergenzien vorinkubiert werden, mit Anionenaustauscher-Material behandelt werden und danach mit einer weiteren Salzlösung gewaschen werden und die Wirkstoffe von dem Anionenaustauscher eluiert werden, um dann in an sich bekannter Weise weiter aufgereinigt zu werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die in den Präparaten enthaltenen Wirkstoffe Nucleinsäuren, wie Plasmid-DNA, sind.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und/oder 2, wobei die natürlichen Quellen Zellen; Zellorganellen, Gewebe oder Mikroorganismen sind.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die natürlichen Quellen durch alkalische Lyse, Druck (French Press), Boiling Lyse, Lysozym, Detergenzien oder Kombinationen davon aufgeschlossen werden zu einem sogenannten "cleared Lysate".

- 13 -

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei das Anionenaustauschermaterial eine Oberflächenladung der Ionenaustauschergruppen von 1 bis 4  $\mu\text{M}/\text{m}^2$  Trägeroberfläche entsprechend 0,5 bis 500  $\mu\text{M}/\text{ml}$  aufweist.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei das Anionenaustauschermaterial auf polymerem Trägermaterial aufgebaut ist, wie Agarose, Acrylamid, Dextran, Silica-gel oder Kombinationen davon.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei eine Vorinkubation des Cleared Lysates mit Salzlösungen einer Konzentration entsprechend einer 0,1 bis 2,0 M NaCl-Lösung durchgeführt wird, insbesondere Salzlösungen der Salze Natriumchlorid, Kaliumchlorid, Guanidiniumhydrochlorid, Natriumperchlorat und anderen chaotropen Salzen, und die Konzentration an nicht ionischen Detergenzien, wie Triton X 114, Triton X 100, NP 40, Tween 20, Tween 80, Syperonic F-68 im Bereich von 0,1 % bis 30 % liegt.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei nach Behandlung des vorinkubierten "cleared Lysate" mit dem Anionenaustauscher-Material ein Waschschrift mit Salzlösungen enthaltend Alkalihalogenide, wie NaCl, KCl, Lithiumchlorid, etc. entsprechend einer Ionenstärke von 0,5 bis 2,0 M NaCl durchgeführt wird.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei im Anschluß an das in Anspruch 1 beschriebene Verfahren Nucleinsäure über anorganische Materialien, wie Silica-gel, Diatomeenerde, Glas, Aluminiumoxid, Titanoxid, Hydroxylapatit oder über organische Materialien, wie Agarose, Dextran, Acrylamid, Polystyrolharze sowie Copolymere aus dem monomeren Baustein der genannten Polymere aufgereinigt werden.

10. Verwendung eines Anionenaustauschers gemäß Anspruch 5 zur Abreicherung oder Entfernung von Endotoxinen aus nucleinsäurehaltigen Präparaten, die zum Einsatz in der Gen, insbesondere Gentherapie vorgesehen sind.
11. Wäßrige Lösung enthaltend Alkalihalogenide in Konzentrationen von 0,1 bis 2,0 M, nichtionische Tenside in Mengen von 0,1 bis 30 % sowie 10 bis 100 mM MOPS.
12. Zusammenstellung enthaltend die wäßrige Lösung gemäß Anspruch 11, endotoxinfreie Pufferlösungen sowie gegebenenfalls Chromatographie- und Filtermaterial.
13. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das cleared Lysate mit NTA-Agarose, IDA-Agarose, Silica-NTA oder deren unvollständigen Syntheseprodukte vorinkubiert wird.



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

T/EP 95/00391

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 6 C07H1/08 C12N15/10 C12P19/34

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 6 C07H C12N C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US,A,4 997 932 (REARDON M.A. AND KLEIN L.S.) 5 March 1991 see claims; examples ---	1, 10
A	WO,A,93 11221 (DIAGEN INSTITUT FUR MOLEKULARBIOLOGISCHE DIAGNOSTIK GBMH) 10 June 1993 see claims; figures; examples ---	1, 10
A	DATABASE WPI Section Ch, Week 8310 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class A96, AN 83-23220 & JP,A,58 013 519 (SEIKAGAKU KOGYO KK) , 26 January 1983 see abstract -----	1, 10



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \* & \* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

4 July 1995

Date of mailing of the international search report

- 6. 07. 95

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Day, G

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 95/00391

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US-A-4997932	05-03-91	EP-A- 0508985 WO-A- 9107422	21-10-92 30-05-91
WO-A-9311221	10-06-93	DE-A- 4139664 WO-A- 9311218 EP-A- 0616638 EP-A- 0616639 JP-T- 7501222 JP-T- 7501223	03-06-93 10-06-93 28-09-94 28-09-94 09-02-95 09-02-95

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inter  
nales Aktenzeichen  
/EP 95/00391A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 6 C07H1/08 C12N15/10 C12P19/34

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 6 C07H C12N C12P

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	US,A,4 997 932 (REARDON M.A. AND KLEIN L.S.) 5.März 1991 siehe Ansprüche; Beispiele ---	1,10
A	WO,A,93 11221 (DIAGEN INSTITUT FÜR MOLEKULARBIOLOGISCHE DIAGNOSTIK GBMH) 10.Juni 1993 siehe Ansprüche; Abbildungen; Beispiele ---	1,10
A	DATABASE WPI Section Ch, Week 8310 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class A96, AN 83-23220 & JP,A,58 013 519 (SEIKAGAKU KOGYO KK) , 26.Januar 1983 siehe Zusammenfassung -----	1,10

☐ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen ☒ Siehe Anhang Patentfamilie

- \* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
  - "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
  - "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
  - "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
  - "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
  - "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
  - "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden
  - "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
  - "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

4. Juli 1995

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

- 6. 07. 95

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Day, G

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 95/00391

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US-A-4997932	05-03-91	EP-A- 0508985	21-10-92
		WO-A- 9107422	30-05-91
WO-A-9311221	10-06-93	DE-A- 4139664	03-06-93
		WO-A- 9311218	10-06-93
		EP-A- 0616638	28-09-94
		EP-A- 0616639	28-09-94
		JP-T- 7501222	09-02-95
		JP-T- 7501223	09-02-95